様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成　25　年　6　月　7　日現在

機関番号：１５２０１
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2012
課題番号：22790930
研究課題名（和文）　質量分析計を利用した血中小麦タンパク質の網羅的分析と体内動態の解析

研究課題名（英文）　Analysis of wheat protein in sera from patients with wheat allergy using mass spectrometer

研究代表者
高橋　仁（TAKAHASHI HITOSHI）
島根大学・医学部・助教
研究者番号：10432618

研究成果の概要（和文）：
小麦製品摂取後の運動時にアナフィラキシー症状を呈した患者において、小麦製品の摂取と運動負荷、アスピリンの摂取を組み合わせた誘発試験時の血清中に特異的に増加する小麦タンパク質を iTRAQ 法で検討した結果、患者の症状誘発時の血清にいくつかの小麦タンパク質は検出されたものの、症状の発現と関係した小麦タンパク質は見いだせなかった。一方、大腸菌で発現させたリコンビナント高分子量グルテニンを用いた IgE 検査は、リコンビナントω-5 グリアジンを用いた IgE 検査と組み合わせることで小麦が原因となる FDEIA の検査に有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：
The aims of this study were to identify wheat proteins in sera of patient with wheat dependent exercise-induced anaphylaxis (WDEIA) during provocation tests using iTRAQ-based analysis, and to evaluate usefulness of CAP-fluorescent enzyme-immunoassay (CAP-FEIA) using recombinant high molecular weight-glutein. In iTRAQ-based analysis, although wheat proteins were detected in patients' sera, those wheat proteins were not involving with allergic reactions.
When recombinant HMW-glutenin was immobilized to CAP-FEIA, it was confirmed that detection of specific IgE anaginst recombinant HMW-glutenin is useful for diagnosis of WDEIA when combined with the CAP-FEIA (recombinant omega-5 gliadin) test.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総　計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学
キーワード：食物アレルギー

１．研究開始当初の背景

食物依存性運動誘発アナフィラキシー(Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: FDEIA) は，特定の食物を摂取後運動負荷により発症する重篤な食物アレルギーの特殊病型である。また、アスピリンなどの非ステロイド系消炎鎮痛薬の内服によっても症状が誘発、あるいは増強される。FDEIA の原因食品は、穀物、魚介類、果物など多岐にわたる。近年、それらの原因抗原の同定が精力的に進められた結果、様々な原因食品に対する抗原が明らかとなり、臨床診断に応用され始めている。本邦では、小麦による FDEIA の頻度が圧倒的に高く、全体の 60%を占める。申請者の研究室は、これまで、小麦が原因となる FDEIA 患者の血清を用いて、系統的に原因小麦抗原の解析を行い、小麦ω-5 gliadin と高分子量グルテニンが主要抗原であることを明らかにするとともに、そのエピトープを同定した。小麦ω-5 グリアジンを大腸菌発現系にてリコンビナントタンパク質を作製し、抗原特異的 IgE 検査法に用いると、従来の小麦およびグルテンを用いた同検査法よりも感度、および、特異度が高く、小麦が原因となるFDEIAの成人患者のおよそ8割が検出可能であることが明らかとなった。また、小麦グリアジンに対する高感度 ELISA を開発し、小麦単独の摂取では血中グリアジン濃度は上昇しないが、小麦と運動負荷により症状が誘発された血清において、症状の出現に先行して血中のグリアジン濃度が上昇していることを明らかにした。また、アスピリン内服においても運動負荷と同様、血中グリアジン濃度が上昇することが明らかとなっている。その機序として、食物摂取のみでは、抗原エピトープが十分に消化されているために症状を誘発しないか、あるいは、抗原タンパク質の吸収が起こらずに体外に排出されることが考えられる。一方、小麦摂取と運動によって症状が誘発される場合、腸管において小麦タンパク質の吸収が増強していることが推測される。しかし、全ての小麦タンパク質の吸収が増加しているのか、あるいは、ω-5 グリアジンなどの特定の小麦タンパク質のみの吸収が増強されているのかは明らかではない。また、小麦が原因となる FDEIA の抗原特異的 IgE 検査においては、ω-5 グリアジンに対して陰性となるおよそ２割の患者は高分子量グルテニンに対するエピトープペプチドを抗原として用いた特異的 IgE 検査によって検出できることが明らかとなっている。しかしながら、エピトープペプチドは固相化しにくい問題がある。一方、リコンビナント抗原はエピトープペプチドよりも固相化しやすく、なおかつ単一のタンパク質であるため、感度・特異度の改善に有用であると考えられる。

２．研究の目的

本研究は、質量分析計を用いて、小麦製品を摂取後に体内に吸収された小麦タンパク質を同定・定量し、アレルギー症状の出現と関与する小麦タンパク質群を明らかにすることを目的とした。併せて、リコンビナント高分子量グルテニンを作製し、抗原特異的 IgE 検査 の抗原として用いた場合の有用性について検討することを目的とした。

３．研究の方法

(A) 質量分析計を用いた血中の小麦タン

パク質の相対的定量、および、同定

(1) 血清

対象は、経口負荷試験時にアレルギー症状を呈した2名の患者とし、対照は1名の健常人とした。用いた血清は、患者の経口負荷試験前、及び、症状発現時の血清、及び、健常人の経口負荷試験前、及び、負荷試験開始後６０分後の血清とした。

(2) 質量分析に供する血清の処理

グルテニンおよび、グリアジンはエタノールに溶解する性質がある。そこで、血清に70%エタノールを添加し、血清タンパク質群から小麦タンパク質群を分画した。

(3)iTRAQ試薬による質量分析

７０%エタノールにて分画した血清タンパク質をトリプシン消化し、生じたペプチドをiTRAQ試薬キット（AB sciex)でラベルした。ラベル反応は取扱説明書に従って行った。反応後、イオン交換スピンカラムによる分画、およびC18逆相スピンカラムを用いたクリーンアップを行った。その後、nano LCによる分画およびターゲットプレートに対するスポットを行った。nanoLCによる分画と同時に、ターゲットプレート上にてα-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸と混合し乾固させた。質量分析計は、MALDI-TOF　TOF 5800 (ABsciex)を用いた。MALDI-TOF　TOFにてレポーターグループのシグナル強度とMSMSフラグメントを測定し、MASCOTサーチエンジン、および、ProteinPilot (ABsciex)で解析した。

(B) リコンビナント高分子量グルテニンの作成とCAP-FEIA法への利用

(1)リコンビナント高分子量グルテニン発現ベクターの作成

1Ax2タイプの高分子量グルテニンをコードする遺伝子が導入された発現ベクター(pEWHx)を京都大学の内海、丸山から供与してもらい、以下の実験を行った。pEWHxを鋳型としてinverse PCR法を用いてN末端アミノ酸配列に６つのヒスチジンタグを導入した後、クローニング用大腸菌DH5α株に形質転換し、得られたプラスミド中の高分子量グルテニン配列および6つのヒスチジンをコードする塩基配列をDNAシーケンサーで確認した。

（２）リコンビナント高分子量グルテニンの発現と精製

得られたプラスミドを大腸菌Rosetta (DE3)株に形質転換し、IPTGによる発現誘導を行い、不溶性タンパク質としてリコンビナント高分子量グルテニンを含む粗抽出液を得た。リコンビナント高分子量グルテニンの精製は、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

（３）CAP-FEIAを用いた特異的IgE抗体価の測定

リコンビナント高分子量グルテニン、および、小麦から精製した高分子量グルテニン（native 高分子量グルテニン)をそれぞれCAP-FEIAに固相化し、血清中抗原特異的IgE抗体価を測定した。血清は、小麦が原因となるFDEIA患者48例、16名のアトピー性皮膚炎患者（AD)、12名の健常人を用いた。

４．研究成果

(A) 質量分析計を用いた血中の小麦タンパク質の相対的定量、および、同定

症状の発現前と発現時の血中小麦タンパク質を相対的に定量するため、経口負荷試験時にアレルギー症状を呈した2名の患者血清および対照としての1名の健常人血清を70%エタノール分画し、トリプシン消化後に得られたペプチドを iTRAQ 試薬でラベルした。MALDI-TOFTOF にてレポーターグループのシグナル強度と MSMS フラグメントを測定し、PloteinPilot で解析した。データベースは全生物を対象としたアミノ酸配列データベースおよびESTデータベースを用いた。その結果、血清中に小麦タンパク質は観察されたものの、症状誘発時の血清に特異的と考えられる小麦タンパク質は見いだされなかった。この理由として、小麦グリアジンのアミノ酸配列はトリプシン認識配列が乏しいため、生じたペプチドの質量が大きくなり本法に不適であること、また、データベースに登録されている小麦タンパク質の種類が少ないため、タンパク質の同定率が低くなったことが原因と考えられた。さらに、NCBI より Triticum に限定したアミノ酸配列およびESTデータベースを取得し、PloteinPilot を用いた解析を行った。全生物を対象としたデータベース検索に比べ、検出された小麦タンパク質の種類は増加したものの、患者の症状誘発時の血清に特異的な小麦タンパク質は見いだせなかった。現在、小麦ゲノムの解析は進行中であり、小麦ゲノムの解読が完了され、なおかつ、反復配列を多く含む小麦タンパク質に適したプロテアーゼが選択できれば、本法を用いた血中小麦タンパク質の解析は有用であると考えられた。

(B) リコンビナント高分子量グルテニンを用いた特異的 IgE 検査

(1) リコンビナント高分子量グルテニンおよび native 高分子量グルテニンに対する患者血清を用いた immunoblot 解析

Native 高分子量グルテニンは 70-100 kDa を有する4つのタンパク質が存在することが知られている。精製したリコンビナント高分子量グルテニンは単一であることが CBB 染色で確認された (Fig. 1)。リコンビナント高分子量グルテニン、および native グルテニンに対する IgE の結合を小麦が原因となる FDEIA 患者2名および健常人2名の血清を用いて immunoblotting 法にて調べた。その結果、リコンビナント高分子量グルテニンおよび native 高分子量グルテニンに対する IgE の結合は患者特異的に検出された (Fig. 1)。

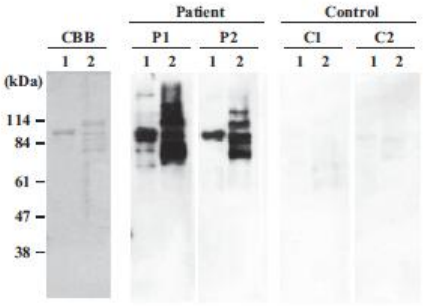

Fig. 1. IgE immunoblot analysis with recombinant HMW-glutenin and native HMW-glutenin. IgE binding to recombinant HMW-glutenin (lane 1) and native HMW-glutenin (lane 2) was determined with immunoblot by using sera of WDEIA patients (P1 and P2) who had serum IgE binding predominantly to epitope peptide of HMW-glutenin. As a negative control, sera of healthy subjects were used (C1 and C2).

(2) リコンビナント高分子量グルテニンおよび native 高分子量グルテニンを固相化した CAP-FEIA の評価

リコンビナント高分子量グルテニン、native 高分子量グルテニン、高分子量グルテニンのエピトープペプチドを CAP-FEIA に固相化し、小麦が原因となる FDEIA 患者 (10 例)、AD 患者、健常人患者の血清中 IgE 抗体価を測定した。その結果、エピトープペプチドに対して

陽性となる4名のFDEIA患者はリコンビナント高分子量グルテニンに対しても陽性となった。一方、16例中12例のアトピー性皮膚炎患者は小麦アレルギーではないものの、native 高分子量グルテニンに対して陽性となった。この結果は、native高分子量グルテニンを用いた特異的IgE検査はリコンビナント高分子量グルテニンを用いた同検査よりも感度が劣ることを示している。

さらに、既存の小麦およびグルテンを用いた特異的IgE検査の陽性率および感度・特異度とリコンビナントω-5 グリアジンおよびリコンビナント高分子量グルテニンを用いたIgE 検査の陽性率および感度・特異度を算出した。48例の小麦が原因となるFDEIA患者における陽性率は、小麦あるいはグルテンに対しては43.8%, リコンビナントω-5グリアジンに対しては 81.3%, リコンビナント高分子量グルテニンに対しては 16.7%であった。AD患者での陽性率は小麦あるいはグルテンに対しては87.5%, リコンビナントω-5グリアジンに対しては 0%, リコンビナント高分子量グルテニンに対しては 12.5%であった。リコンビナントω-5 グリアジンの感度および特異度はそれぞれ 81.3%、100%であった。リコンビナント高分子量グルテニンの感度特異度はそれぞれ 16.7%、92.9%であった。さらに、リコンビナントω-5グリアジンと離リコンビナント高分子量グルテニンの両者を用いた場合の感度および特異度はそれぞれ 93.8%、92.9%であった。一方、小麦あるいはグルテンを用いた場合の感度および特異度はそれぞれ50%であった。

これらの結果から、リコンビナント高分子量グルテニンは固相化および特異性の点で優れ、さらに、リコンビナントω-5グリアジンを用いたIgE検査と同時に用いることで小麦が原因となるFDEIA患者の検出に有用であることが明らかとなった。
以上の結果は、Clinical and Experimental Allergy 誌に投稿し、掲載された（Clin Exp Allergy. 2012 Aug;42(8):1293-8. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.04039.x.）。

５．主な発表論文等
［雑誌論文］（計５件）

1. Kohno K, Matsuo H, Takahashi H, Niihara H, Chinuki Y, Kaneko S, Honjoh T, Horikawa T, Mihara S, Morita E. Serum gliadin monitoring extracts patients with false negative results in challenge tests for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. Allergol Int. 2013; 62: 229-38. （査読あり）

2. Chinuki Y, Takahashi H, Dekio I, Kaneko S, Tokuda R, Nagao M, Fujisawa T, Morita E. Higher allergenicity of high molecular weight hydrolysed wheat protein in cosmetics for percutaneous sensitization. Contact Dermatitis. 2013; 68: 86-93. （査読あり）

3. Chinuki Y, Kaneko S, Dekio I, Takahashi H, Tokuda R, Nagao M, Fujisawa T, Morita E.CD203c expression-based basophil activation test for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2012; 129: 1404-6. （査読あり）

4. Morita E, Chinuki Y, Takahashi H, Nabika T, Yamasaki M, Shiwaku K. Prevalence of wheat allergy in Japanese adults. Allergol Int. 2012; 61: 101-5. (査読あり)

5. Takahashi H, Matsuo H, Chinuki Y, Kohno K, Tanaka A, Maruyama N, Morita E. Recombinant high molecular weight-glutenin subunit-specific IgE detection is useful in identifying wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis complementary to recombinant omega-5 gliadin-specific IgE test. Clin Exp Allergy. 2012; 42: 1293-8. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 松山梓、横大路智治、高橋仁、森田栄伸、松尾裕彰. 小麦水溶性アレルゲンの大腸菌における可溶化発現. 日本皮膚科学会第 124 回山陰・第 20 回島根合同開催地方会 ホテルサンルート米子(米子市). 2012 年 7 月 22 日.

2. 千貫祐子、松尾裕彰、新原邦江、高橋仁、田中昭、森田栄伸. リコンビナント小麦蛋白質特異 IgE 測定の有用性. 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 軽井沢プリンスホテルウエスト(軽井沢). 2012 年 7 月 13-15 日.

3. 高橋 仁、千貫祐子、森田栄伸. 食物アレルギーとセツキシマブアレルギー. 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 軽井沢プリンスホテルウエスト(軽井沢). 2012 年 7 月 13-15 日.

4. 高橋 仁、千貫祐子、森田栄伸. 牛肉アレルギーの抗原の同定とセツキシマブとの交叉反応性. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 大阪国際会議場(大阪市). 2012 年 5 月 11-13 日.

６. 研究組織

（１）研究代表者

高橋 仁 (TAKAHASHI HITOSHI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10432618